

СТРОЕНИЕ БЕЛКОВ<sup>1)</sup>*Дж. Д. Бернал, Лондон*

Структура белков представляет собой одну из важнейших нерешенных проблем в пограничной области между химией и биологией. Мы должны признаться, что до сих пор не владеем ключом к решению этой задачи, хотя за последние годы было получено много фактов, позволивших найти новые пути подхода к этой проблеме.

Вопрос о структуре белков распадается на две части: это, во-первых, вопрос о форме и свойствах белковой молекулы и, во-вторых, вопрос об ее внутреннем строении. Ввиду крайней неустойчивости белковой молекулы ее исследование возможно лишь наиболее деликатными физическими методами. Наибольший успех выпал на долю трех методов: центрифугирования, электрического и рентгенографического методов. Фундаментальные результаты были получены при помощи ультрацентрифуг и почти все они были достигнуты в лаборатории Сведберга<sup>1</sup>. В достаточно сильных центробежных полях молекулы белков выпадают из раствора, и при помощи соответствующей константы седиментации могут быть получены достаточно точные значения для молекулярных весов. Правда, все еще остаются сомнения, действительно ли то, что измеряется при этом, является белковой молекулой, так как всегда необходимо считаться с неизбежной ассоциацией с этими молекулами той жидкости, в которой молекулы взвешены.

Наиболее поразительным открытием Сведберга является установление факта, что получающиеся величины молекулярных весов близки некоторым более или менее постоянным числам, которые относятся между собой как целые небольшие числа. Это открытие делает весьма вероятным представление о том, что все белки составлены из некоторых общих единиц. До сих пор, однако, трудно сказать, что представляет собой подобная единица. Еще недавно белковой единице приписывался молекулярный вес 35 000; однако за последнее время удалось выделить белки с молекулярным весом 17 000 и даже 10 000. Кроме того, критическое рассмотрение имеющихся данных показывает, что закон кратных отношений выдерживается не особенно строго, и мы имеем лишь концентрацию молекулярных весов в определенных интервалах. Нет сомнения, однако, что в белках, близких между собой по химическим свойствам, кратные отношения соблюдаются достаточно строго. Так например, как гемоглобины, так и гемоцианины могут быть обратимо разложены на 2, 4 или 8 частей. Однако все еще остается сомнительным, могут ли быть распространены эти отношения на все белки. В частности, изучение вязкости показало, что белки, характеризующиеся одним и тем же молекулярным весом, как, например, инсулин и глицин, могут различаться между собой по форме совершенно существенным образом: первый характеризуется весьма сплюсненной сфероидальной формой, тогда как второй обычно имеет форму вытянутого стержня. Поэтому весьма трудно себе представить общую физическую структуру для этих двух белков.

<sup>1)</sup> Nature, 143, 663, 1939. Перевод Н. В. Белова.

Было высказано предположение, что разнообразие молекулярных весов белков внутри одного и того же свединерговского класса обусловлено различием в числе аминокислотных групп К, содержащих имеющиеся аналитические материалы не дает возможности установить действительно ли приведенное объяснение правильно. Число 288 аминокислотных остатков в классе белков, характеризующемся молекулярным весом 35 000, во всяком случае на сегодняшний день должно считаться не больше, как остроумным предположением.

Второй способ более глубокого подхода к вопросам строения белков сводится к изучению электрических свойств этих молекул. Работы Кона, Тинелли и других привели к предположению, что белковая молекула в растворе как о частица, поверхность которой достаточно обильно покрыта положительными и отрицательными зарядами обусловленными кислотными и основными свойствами аминокислотных боковых цепей. Число этих групп определяется условиями среды. Белковая молекула, таким образом, во внешних своих частях имеет существенно ионный характер и, вероятно несет вокруг себя ионную атмосферу, достаточно далеко распространяющуюся в том растворе (воде), в котором она находится.

Третий метод подхода к строению белков — это рентгенографический метод. Прекрасные кристаллические формы, которые наблюдаются у белков, которые известны уже в течение столетия, всегда привлекали внимание рентгенографа, но вплоть до последних пяти лет все попытки анализа разбивались вследствие нестойкости белковых кристаллов и их чрезвычайно ничтожных размеров. Лишь с 1934 г. удалось, наконец, подвергнуть рентгенографическому изучению значительное число типичных белковых кристаллов. Соответствующие эксперименты производились над кристалликами, остающимися в своем маточном растворе (в небольших трубочках), поскольку большая часть, а может быть и все белки распадаются при попытке исследовать их в сухом состоянии. Уже первые результаты этих исследований привели к установлению весьма важных и до сих пор неизвестных фактов. Прежде всего оказалось, что рентгенограммы таких кристаллов отличаются чрезвычайной четкостью картин. Все они приводят к очень крупным элементарным ячейкам с весьма большим числом рефлексов на рентгенограмме качания, причем, эти отражения получаются четкими даже при весьма больших углах, отвечающих междуплоскостным расстояниям 2 Å и ниже. Это показывает, что молекулы белков не только принципиально сходны по форме и по размерам, но что они в каждом отдельном случае вообще идентичны и обладают правильным внутренним строением вплоть до атомных размеров.

Зная размер элементарной ячейки и молекулярные веса соответствующих кристаллов можно было бы рассчитать вес материи внутри каждой единицы соответствующего чиста, однако не дают непосредственных молекулярных весов по следующим причинам. Во первых, мы не знаем чиста молекул в элементарной ячейке во-вторых, трудно определить, какая часть веса материи внутри элементарной ячейки обуславливается белковым веществом и какая часть определяется связанной водой. Измеряя количество последнего термическим способом, мы все же знаем молекулярный вес «сухого веса» — цифре, весьма и достоверной, из которой можно было бы сравнить с теми результатами, которые дают рентгенографические анализы (соответствующие результаты показали, что цифры очень хорошо укладываются в систему, если принять, что каждая ячейка содержит лишь небольшое число молекул 2, 4 или 8. Таким образом рентгенографический метод позволяет вычислить вес и размер молекулярные веса, хотя и не может определить соответствующую данному объекту точность. Можно думать, что большинство белков построено из суб единиц, которые хотя и обладают приблизительно одинаковым весом, но химически не являются идентичными, и поэтому соответствующие белки лучше называть не молекулами, но молекулярными соединениями.

Наиболее замечательный результат измерения элементарных ячеек кристаллических белков это то значительное изменение этих ячеек, которое происходит при подсушивании белков. Во многих случаях уменьшение ячейки достигает 50%. Еще более замечателен факт, что это сжатие ячейки весьма часто ограничивается лишь одним или двумя измерениями ячейки. Возможны два объяснения этого факта. Первое исходит из того предположения, что молекулы белков связаны в агрегаты чрезвычайно рыхлым образом и что эти агрегаты при удалении воды разрушаются, оставляя скелет молекул, упаковывающихся более плотно. Другое объяснение исходит из представления об отдельных молекулах, которые разделены между собой ионными атмосферами, определяющимися соответствующими зарядами и фактически являющимися промежуточными слоями свободных молекул воды. Вероятно, в общем случае мы имеем оба фактора с большим преимуществом того или другого в отдельных случаях. Так, для гемоглобина, характеризующегося при подсушивании весьма значительным сжатием элементарной ячейки от 55 до 38 Å в одном направлении, весьма трудно представить наличие ионной атмосферы, поскольку соответствующие кристаллы почти не содержат солей и характеризуются изоэлектрической точкой  $pH = 6,8$ . Наоборот, замечательные свойства мозаичного вируса табака весьма трудно объяснить каким-либо другим предположением. Этот вирус характеризуется длинными тонкими частицами, имеющими тенденцию располагаться параллельно друг другу и на равных расстояниях вплоть до концентраций 1,3%, а вероятно, даже до 1,5%. Трудно было бы себе представить какую-либо иную причину этой правильности без соответствующих ионных атмосфер. В самое последнее время нами было показано, что равновесное расстояние между частицами в весьма значительной степени определяется  $pH$  и концентрацией солей; так например, мы имеем 320 Å при  $pH = 7$  и 206 при  $pH = 3-4$ . Нет сомнения, что уже теперь может быть создана количественная теория этих фактов, и начатки ее мы находим в работах Лэнгмюра<sup>4</sup> и Левина<sup>5</sup>.

Во всяком случае, сейчас мы можем более или менее определенно представить общую картину поверхности белковых молекул. Эти молекулы мы должны мыслить себе как сфероидальные тела размерами от 30 до 100 Å, покрытые гидрофильными группами, которые имеют заряды обших знаков. Кроме того, каждая такая молекула в растворе несет с собой атмосферу из ионов.

Вопрос о внутреннем строении белковых молекул представляется несравненно более сложным. Всякая сколько-нибудь подробная картина строения белка должна объяснить прежде всего те общие свойства, которые характерны для всех белков и которые проявляются в соответствующих химических и физических свойствах, и лишь далее те специфические свойства, которыми характеризуется данный тип белка. Весьма вероятно, хотя это и невозможно строго доказать, что первый ряд свойств определяется одинаковостью общего характера распределения аминокислот. Более или менее определенное указание по этому поводу мы имеем в результате изучения волокнистых белков. В этой области ввиду технической важности соответственных продуктов и ввиду большего удобства работы с ними мы уже имеем весьма значительные результаты, связанные главным образом с именем Астбюри<sup>6</sup>, ведущим свои исследования весьма упорно по хорошо разработанному плану.

Полностью растянутое волокно -кератина характеризуется очень резко выраженным периодом идентичности 3,5 Å, отвечающим длине одного аминокислотного остатка, и, кроме того, двумя периодами 10 и 4,5 Å, соответствующими направлениям под прямыми углами к осям цепочек. Одним из наиболее значительных открытий Астбюри было установление факта, что эти последние направления периодичности также составляют между собою прямые углы. Другими словами, повторяющаяся единица в строении полностью растянутого белка характеризуется определенными размерами во всех трех измерениях. Значение этих периодов

также не вызывает, повидимому, сомнений, а именно; расстояние  $10 \text{ \AA}$  отвечает длине боковых цепей аминокислотных остатков, тогда как  $4,5 \text{ \AA}$  представляет собой расстояние между главными цепочками («хребтами»), связывающимися между собою группами CO и NH. В более короткой  $\alpha$ -форме расстояние  $10 \text{ \AA}$  сохраняется, тогда как расстояние  $4,5 \text{ \AA}$  пропадает, что можно считать указанием на то, что цепочки «складываются», но что это складывание происходит в одной плоскости, а не в двух, как это имеет место в каучуке. До сих пор остается неясным, каков действительный механизм этого складывания, но несомненно, что он чрезвычайно важен, поскольку, вероятно, это тот же самый механизм, который работает в мышечных белках.

Значение этих результатов для общей проблемы белка определяется во-первых, тем, что все до сих пор изученные растворимые белки в результате денатурации превращаются в волокнистый материал, который может быть ориентирован и который, повидимому, в основных чертах строения идентичен  $\beta$ -кератину. И, во-вторых, несомненно, что реальные изменения, которые происходят в кристаллическом белке при его денатурации, должны быть весьма незначительны. Это явствует из близкого сходства дебаграмм кристаллических белков перед и после денатурации, а также из наблюдений Астбюри, Дикинсона и Бейли<sup>7</sup>, что монокристаллы эксцельзина при частичной денатурации дают волокна, ориентированные в направлении осей кристалла. Перуц<sup>8</sup> показал совершенно другим методом, а именно изучением спектров поглощения в различных направлениях кристалла, что положение простетических групп в гемоглобине при денатурации не изменяется.

Мы имеем весьма много работ со снимками кристаллических белков, показывающими характерные отличия отдельных белков, но все же более подробного подхода к соответствующим снимкам мы до сих пор не имеем и не в состоянии интерпретировать соответствующие дифракционные картины. Рентгенограммы кристаллических белков характеризуются сотнями отдельных пятен с весьма значительными различиями в интенсивности. Несмотря на это, прямой анализ этих рентгенограмм невозможен за счет того обстоятельства, что мы не можем установить фаз для отражений, соответствующих отдельным пятнам. Повидимому, однако, соответствующая неопределенность может быть обойдена при помощи чисто физических приемов, например путем введения тяжелых атомов или же путем наблюдения тех изменений в интенсивности, которые происходят при обезвоживании. До сих пор, однако, практически это не было осуществлено. Кроме того, для всех изученных белков, за исключением одного случая, вопрос усложняется наличием в ячейке более чем одной сведберговской единицы.

Соответствующая рентгенограмма в этих случаях определяется как расположением молекул в ячейке, так и внутренним строением каждой молекулы. К счастью, мы знаем одно исключение, а именно инсулин, который характеризуется всего лишь одной молекулой в ячейке. Кроуфут<sup>9</sup> произвела рентгенографическое изучение сухих кристаллов инсулина с определением интенсивности отражений. К сожалению, не удалось изучить влажных кристаллов; сухие же кристаллы не дают отражений, отвечающих междуплоскостным расстояниям менее  $8 \text{ \AA}$ . В результате мы не имеем исходных данных для суждения о тонкой структуре молекулы. Полученные результаты в отношении грубой структуры, однако, весьма убедительны и подтверждаются также соответствующими проекциями двойного ряда Паттерсона<sup>1</sup>).

<sup>1</sup> Двойным рядом Паттерсона называется двумерный ряд Фурье, коэффициентами которого являются экспериментально измеряемые интенсивности рентгеновских дифракционных лучей. Паттерсон показал, что сумма такого ряда обладает тем свойством, что координаты максимумов ее указывают на расстояния между местами наибольшей концентрации рассеивающей массы. Ряд Паттерсона дает достаточно точные указания с

Вообще говоря, совершенно естественно допустить, хотя фактически будет лишь произвольным упрощением, что пики на паттерсоновской проекции соответствуют расстояниям между небольшим числом точек с высокими концентрациями рассеивающей материи. Были сделаны попытки свести анализ к нахождению того пространственного узора точек, который дает максимумы в нужных местах. Все такие попытки нужно считать неудовлетворительными, поскольку легко найти очень большое число таких точечных узоров, которые дадут правильные расстояния на базисной проекции и которые, однако, не будут отвечать другим разрезам ячейки. Все сделанные до сих пор попытки<sup>10</sup> в конце концов сводятся к произвольному выбору некоторого числа векторов, и обнаруженные закономерности исчезают при другом выборе последних<sup>11</sup>. Та неудача, которой до сих пор окончивались попытки найти точечное решение задачи, приводит к заключению, что мы имеем дело с группами, характеризующимися размерами того же порядка, как и взаимные расстояния, и что, в частности, наблюдающееся усиление рефлексов на расстояниях 10 и 4,5 Å отвечает расположению боковых цепочек или хребтовым расстояниям, аналогичным тем, с которыми мы имеем дело в волокнистых белках.

Имеющийся на сегодняшний день рентгенографический материал все еще не дает хоть сколько-нибудь детальной картины строения белков. Можно сказать, что еще до сих пор основное значение рентгенографических методов сводилось к опровержению тех гипотетических структур, которые были предложены ранее. Все же, однако, уже сейчас возможно сформулировать в более общих чертах различные возможные способы группировки и предложить некоторые рабочие гипотезы, которые могли бы быть руководящими в дальнейшей исследовательской работе.

Формальные задачи, которые ставятся при изучении строения белковой молекулы, таковы.

- а) Какова природа связи между аминокислотными остатками?
- б) Участвуют ли эти связи во всей массе молекулы или же они только сосредоточиваются в определенных ее частях. Другими словами, связана ли вся молекула белка лишь одними первичными валентными связями или же эта молекула составлена суб-единицами, связанными каким-то другим образом?
- в) Если существуют эти суб-единицы, то какова природа связи между ними?

Что касается первого вопроса, то затруднение при объяснении образования сферических молекул из линейчатых пептидных цепочек привело к представлению о другом способе связи, допускающем соединение каждого аминокислотного остатка не с двумя только соседними, но с четырьмя. Хотя эта гипотеза на первый взгляд кажется имеющей теоретические преимущества, но все же за нею не стоит никаких химических оснований, и, наоборот, именно со стороны химиков-экспериментаторов она встречает серьезные возражения. В химии белков мы стоим и так перед большим числом неизвестных факторов, что делает нежелательным введение сомнительных с химической точки зрения допущений.

Вопрос о характере единиц, составляющих белковую молекулу, остается, независимо от того, является ли связь между аминокислотными остатками пептидной или же нет. Конечно, при многократной связи легче построить модели клеточного или же сфероидаального типа, но, как уже было указано, подобные непрерывные структуры трудно согласовать с 10 Å-разрывами, которые систематически показывают рентгенограммы. В случае допущения пептидной связи, однако, становится затруднитель-

структуре лишь при весьма большом числе членов ряда и для не очень сложных кристаллов. Критика Бернала попыток модификации метода Паттерсона для анализа структуры белков вполне основательна. Несомненно, что этим путем проблема структуры белка разрешена быть не может.

*Прим. ред.*

ным выделение отдельных единиц. Трудно себе представить какую-либо складку или петлю, которая позволяла бы отдельной цепочке занять соответственный участок пространства и в то же время не быть столь сложной, чтобы сделать образование ее в результате природного процесса исключительно невероятным. Однако уже сейчас мы обладаем многочисленными доказательствами в пользу того, что по крайней мере крупные белковые молекулы не являются монообразованиями. Это следует прежде всего из того, что многие из таких молекул в растворе могут быть расщеплены на частицы с молекулярным весом порядка 10 000, причем вероятно, что эта цифра не является предельной и что более мелкие частицы просто более трудно изолируются и измеряются.

Две характерные особенности рентгенографического метода также указывают на эти суб-единицы, а именно: высокая симметрия белковых кристаллов и периоды 10 Å. Симметрия белковых кристаллов значительно выше того, что могло быть статистическим результатом для столь сложных соединений. Эта симметрия, несомненно, указывает, что хотя каждая молекула быть может и собрана из несимметрических суб-единиц, последние ориентируются симметрическим образом. Размеры этих суб-единиц должны лежать между размерами наименьших наблюдаемых белковых молекул, т. е. отвечающих молекулярному весу 9 000, и размерами отдельных аминокислот с молекулярным весом в среднем около 120. Таким образом каждая суб-единица является каким-то делителем от числа 72 аминокислотных остатков. Неопределенность вызывается тем фактом, что такие суб-единицы не обязательно должны быть все одинаковы, хотя условия симметрии и ограничивают эту неодинаковость немногими сортами. Характерная тригональная симметрия кристалла позволяет заключить, что асимметрическая единица должна заключать в себе третью часть или еще более малую от этого числа, т. е. содержать в себе 24, 12 или 8 аминокислотных остатков.

Вопрос о строении суб-единиц на первый взгляд представляет те же затруднения, что и строение самих молекул. В действительности, однако, с уменьшением числа остатков затруднения и невероятности в процессе сворачивания становятся значительно меньшими, в особенности, если мы постулируем (со значительным основанием), что суб-единицы являются замкнутыми пептидными кольцами. Подобные кольца обязательно должны закручиваться за счет взаимного притяжения несущих положительный и отрицательный заряд амино- и кетогрупп, и модели таких закрученных цепочек легко построить с сохранением всех тех расстояний, которые найдены были для подобных групп в других соединениях. На этот раз основное затруднение сводится к тому, что мы имеем как раз очень большое число подобных моделей и не имеем критериев к выбору между ними. Метод сворачивания в цепочки внутри суб-единиц, весьма вероятно, подобен тому, которым характеризуются сжавшиеся формы волоконистых белков.

Постулирование суб-единиц приводит к ряду дальнейших вопросов о структуре молекул. В самом деле, последние должны быть связаны достаточно крепко, чтобы такие молекулы не распались ни в водном, ни в ионном растворе. Химия дает нам очень ограниченное число таких связей. Ионные связи можно не принимать во внимание, поскольку последние в водном растворе будут гидратированы и разрушены. Остается возможность аминокарбоксильных связей между концами боковых цепочек. Но и эта возможность имеет против себя многое. Представляется более вероятным, что связи будут одного из следующих двух типов: S—S-связь и ассоциация гидрофобных групп. В некоторых случаях можно ожидать обоих типов связей. При малом числе суб-единиц число S—S-связей, необходимых для скрепления всей молекулы, обеспечивается теми количествами серы, которые обнаружены во всех до сих пор изученных белках. И та чрезвычайная перемена в активности, которую претерпевают белки при нарушении S—S-связей, показывает, что эта связь действительно играет фундаментальную роль в строении белковой молекулы. Характерные свойства гидрофобных групп в белках, несомненно,

также являются важным фактором взаимной связи. Как показали Даниели<sup>13</sup> и Лэнгмюр<sup>14</sup> на основании своих работ по поверхностным пленкам, белковая молекула в растворе должна устраиваться таким образом, чтобы ее гидрофобные группы были вне контакта с водой, т. е. последние должны контактировать друг с другом. На поверхности раствора молекула разрывается на пленку толщиной в 10 Å, в которой все гидрофобные группы вытолкнуты наружу, чтобы не иметь контакта с частицами воды. Таким образом действительно налицо значительная ассоциирующая сила, которая в конечном счете сводится не столько к взаимному притяжению гидрофобных групп, но главным образом к их отталкиванию от водной среды.

Лэнгмюр использует только что нарисованную картину для подтверждения гипотезы о циклольных клетках; однако ясно, что это вещи, друг от друга независимые, и что модель, только что разобранный нами, в частности, может весьма удовлетворительно объяснить явления денатурации, в особенности в поверхностных слоях. В тот момент, когда суб-единицы появляются на поверхности, их кольца попадают в одну плоскость, причем различные кольца могут взаимодействовать в соответствии с хорошо известным процессом полимеризации кольцевых цепочек, что и приводит к образованию тех волокон, присутствие которых было показано Астбюри в пленках. Подобный процесс полимеризации совершается достаточно медленно, как показала работа Даниели.

Нарисованная нами картина далеко еще не является окончательной или же даже просто удовлетворительной. Основным моментом, который требует выяснения, является более или менее точный механизм сворачивания и разворачивания пептидных цепочек; чтобы получить соответствующее решение, нам придется подождать, вероятно, еще значительное время до тех пор, пока техника рентгенографии и других аналогичных методов не продвинется достаточно далеко. Вопрос о строении белков мы можем, однако, уже сейчас считать имеющим конкретное решение, но существенные успехи смогут быть получены лишь в том случае, когда будет достигнута большая согласованность между отдельными исследователями, чего мы не имеем сейчас. Работы остаются не только не согласованными, но различные авторы исследуют различные белки различными методами, в то время как несомненно, что концентрированное и строго планированное наступление на проблему структуры белка сэкономило бы много сил и привело бы к более быстрому решению задачи.

## ЛИТЕРАТУРА

1. T. Svedberg, Proc. Roy. Soc., A 170, 40, 1939.
2. J. D. Bernal a. D. Crowfoot, Nature, 133, 794, 1934.
3. J. D. Bernal и другие, Nature, 141, 521, 1938.
4. I. Langmuir, J. Chem. Phys., 6, 873, 1938.
5. S. Levine, Proc. Roy. Soc., A 170, 145, 1939.
6. W. T. Astbury, Fundamentals of Fibre Structure, Phil. Trans., 232, 333, 1933.
7. Biochem. J., 29, 2351, 1935.
8. Частное сообщение.
9. D. Crowfoot, Proc. Roy. Soc., A 164, 580, 1938.
10. J. Am. Chem. Soc., 60, 2247, 1938.
11. J. D. Bernal, Nature, 143, 74, 1939.
12. A. Neuberger, Proc. Roy. Soc., A 170, 64, 1939.
13. J. F. Danielli, Proc. Roy. Soc. A 170, 73, 1939.
14. I. Langmuir a. D. Wrinch, Nature, 143, 49, 1939.